



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 130 946** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) МПК⁶ **C 07 K 14/75, A 61 L 25/00**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 96119971/04, 28.02.1994

(46) Дата публикации: 27.05.1999

(56) Ссылки: DE 3622642 A1, 1988. DE 3001435 A, 1980. GB 2041942 A, 1980. EP 0305243 A, 1989. SU 1833741 A1, 1993.

(85) Дата перевода заявки PCT на национальную фазу: 28.09.96

(86) Заявка PCT:
CA 94/00105 (28.02.94)

(87) Публикация PCT:
WO 95/23167 (31.08.95)

(98) Адрес для переписки:
129010, Москва, ул.Б.Спасская, д.25, стр.3
ООО "Союзпатент"

(71) Заявитель:
Эмакюр Биотек Инк. (CA)

(72) Изобретатель: Трунг Буи-Хак (CA),
Лизе Ловои (CA), Доминик Мишел Ст Пик (CA)

(73) Патентообладатель:
Эмакюр Биотек Инк. (CA)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОГО КЛЕЯ, ИЗГОТОВЛЕННОГО ИЗ КОНЦЕНТРИРОВАННЫХ КОАГУЛИРУЮЩИХ ФАКТОРОВ ПОСРЕДСТВОМ "ВЫСАЛИВАНИЯ"

(57) Реферат:

Изобретение относится к способу приготовления концентрата коагулирующих белков из цельной плазмы человека или животного, используемого в качестве биологического клея, который произвольно смешивают с тромбином. Концентрированные белки включают в себя в основном фибриноген, стабилизирующий фибрин фактор (Фактор XII) и фибронектин. Способ, являясь коротким по выполнению, не требует добавления ингибитора протеазы, обеспечивает превосходный выход коагулируемых белков, предусматривает

стадии отделения посредством "высаливания" в присутствии аминок-6-гексановой кислоты, которая предотвращает соосаждение плазминогена с желаемыми коагулируемыми белками. Полученные белки являются очень стабильными после реконституирования в воде в течение по меньшей мере 24 ч при комнатной температуре или при температуре тела. После смешивания с тромбином и кальцием этот биологический клей обнаруживает превосходную адгезионную прочность и биосовместимость. 13 з.п. ф-лы.

RU 2 130 946 C1

RU 2 130 946 C1



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 130 946** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) Int. Cl.⁶ **C 07 K 14/75, A 61 L 25/00**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 96119971/04, 28.02.1994
(46) Date of publication: 27.05.1999
(85) Commencement of national phase: 28.09.96
(86) PCT application:
CA 94/00105 (28.02.94)
(87) PCT publication:
WO 95/23167 (31.08.95)
(98) Mail address:
129010, Moskva, ul.B.Spasskaja, d.25, str.3
OOO "Sojuzpatent"

(71) Applicant:
Ehmakjur Biotek Ink. (CA)
(72) Inventor: Trung Bui-Khak (CA),
Lize Lovoi (CA), Dominik Mishel St Pik (CA)
(73) Proprietor:
Ehmakjur Biotek Ink. (CA)

(54) **METHOD OF PREPARING BIOLOGICAL ADHESIVE MADE OF CONCENTRATED COAGULATING FACTORS BY SALTING OUT**

(57) **Abstract:**

FIELD: biochemistry, more particularly preparation of concentrate of coagulating proteins from whole human or animal plasma used as biological adhesive. SUBSTANCE: concentrated proteins comprise predominantly fibrinogen stabilizing fibrin factor (factor XIII) and fibronectin. Method does not take much time to accomplish, does not require addition of protease inhibitor, gives excellent yield of proteins to be coagulated, involves stages of separation by

"salting out" in the presence of amine-6-hexanic acid which prevents co-precipitation of plasminogen with desired proteins to be coagulated. The resulting proteins are very stable after reconstituting in water for at least 24 hours at room temperature or at body temperature. After being mixed with thrombin and calcium, this biological adhesive shows superior adhesive strength and biocompatibility. EFFECT: more efficient preparation method. 15 cl, 2 ex

RU 2 130 946 C1

RU 2 130 946 C1

Биологические клеи олицетворяют новый подход к хирургии и наложению швов. Хирурги в течение продолжительного времени искали эффективный, легкий в использовании и, прежде всего, легкопереносимый клей, который можно было бы применять в дополнение к швам или вместо швов.

В настоящее время наложение швов является очень важным. Однако, при этом возникают многочисленные проблемы, такие как непереносимость или токсичность.

Первый тканевый клей на основе синтетических продуктов появился в 60-ых годах, это был клей из семейства цианакрилатов. Он является сильным клеем, полимеризующимся в течение нескольких секунд, но его применение обнаруживает значительную токсичность для клеток. Другие синтетические клеи того же самого семейства с более длинными радикалами также обладают гемостатическими, бактериостатическими и заживляющими свойствами, но они также обнаруживают проблемы, связанные с воспалительными реакциями и токсичностью для тканей, которые все еще слишком значительны. В 1967 году были получены клеи на основе формальдегида, содержащие желатин, резорцин и формалин. Они привнесли определенное улучшение - менее токсичны, чем предшествующие клеи, но были зарегистрированы аллергические реакции и тканевая токсичность, вызываемые формалином.

Воспалительные реакции, тканевая токсичность и аллергия приводят к отторжению этих не очень совместимых биологических клеев.

В силу этих различных причин проводится исследовательская работа для разработки клея, объединяющего в себе следующие свойства:

- достаточную адгезивность;
- хорошую эластичность;
- хорошее удерживание соседних тканей;
- отсутствие токсичности;
- отсутствие метаболического действия;
- хорошую переносимость.

Кровь, благодаря ее свойствам коагуляции, всегда представляла собой для хирургов идеальную модель биологического склеивания.

Склеивающая сила сгустка крови, благодаря его каркасу из полимеризованного фибрина, была известна в течение длительного времени. Фибрин использовали с начала этого столетия в качестве клея. В 1909 году Bergel считал его физиологическим склеивающим веществом и, кроме того, приписывал ему заживляющие свойства. За этим открытием сразу же последовала работа Grey, который использовал фибриновые тампоны для остановки мозговых кровотечений и кровотечений в печени. Однако только в 1944 году Cronkite, а затем Tidrick и Warner использовали фибриноген вместе с тромбином для пришивания кожного трансплантата. Однако низкая концентрация этих продуктов не позволяла достичь ни хорошего качества склеивания, ни продолжительного эффекта. С 1946 года, благодаря важному научному исследованию E.J. Cohn по фракционированию белков плазмы, использовали, в частности,

коагулирующие белки, и несколько лет спустя был выяснен механизм коагуляции и обнаружены основные коагулирующие белки, в том числе известный фактор XIII.

В 1975 году Matras впервые использовал адгезивные свойства фибрина через высококонцентрированный фибриноген.

Данное изобретение состоит в изготовлении концентрата, богатого фибриногеном и стабилизирующим фибрин фактором (Фактором XIII) из цельной плазмы крови человека или животного. Этот концентрат обладает всеми необходимыми свойствами, приводящими к коагуляции в присутствии тромбина. Описанный ниже способ представляет собой способ приготовления и использования этого концентрата для терапевтических целей.

Вследствие его коагулирующих свойств этот концентрат обеспечивает практикующих врачей ценным и эффективным средством для хирургии, когда крайне необходимы крововосстанавливающие (гемостатические) свойства. Области клинических применений могут быть: нейрохирургия, сердечно-сосудистая хирургия, пластическая хирургия (пересадка кожи), ORL хирургия, стоматология, ортопедическая хирургия, общая хирургия и травматология.

Основным белком в этом концентрате является фибриноген, который посредством ферментативной реакции в присутствии тромбина и ионов кальция производит фибринопептиды А и В, делая возможным образование мономеров фибрина. Эти мономеры быстро полимеризуются и превращаются в растворимый фибрин. Затем стабилизирующий фибрин фактор при посредничестве ионов кальция образует ковалентные связи с растворенным фибрином и делает его стабильным и не растворимым в кислой среде или в присутствии мочевины.

Образуемый таким образом фибрин является необратимым, стабильным и вполне пригодным для того, чтобы играть роль коагулянта. Он противостоит фибринолизу вследствие его высокой концентрации и сохраняет свою форму в результате отсутствия эксудации. Этот концентрат имеет следующие характеристики: превосходную стабильность после повторного растворения в водном растворе, солибилизацию при комнатной температуре в течение нескольких минут, хорошую эластичность и, наконец, хорошую адгезивность.

Эти характеристики зависят только от способа приготовления из плазмы. Этот способ является простым быстрым способом, легко приспособляемым к промышленному получению. Все биологические и биохимические свойства концентрата сохраняются, и этот продукт удовлетворяет требованиям практикующих врачей.

Уже имеются биологические клеи, описанные в патентах Канады N 1128859 и N 1254154, которые содержат фибриноген и фактор XIII. Эти клеи изготовлены из криопреципитата плазмы при +2°C. Этот криопреципитат затем обрабатывают буфером, содержащим активатор-ингибитор плазминогена или ингибитор плазмина, которые остаются в конечном продукте. Эти продукты обнаруживают интересные характеристики. Но их способ получения является довольно сложным и требует

применения вспомогательных средств, таких как ингибиторы, в частности ингибиторы из животных источников, например апротинина, и белков плазмы из человека, например альбумина, во время получения.

Кроме того, продукты, полученные согласно этим вышеупомянутым патентам, не растворимы ни в водном растворе, ни при комнатной температуре. Они растворимы при 37°C при механическом перемешивании с магнитным стержнем, введенным в колбу перед лиофилизацией. Однако, несмотря на высокую температуру и специальное оборудование, эти продукты требуют более 30 минут для образования гомогенного раствора.

Другой способ приготовления биологического клея описан в европейском патенте N 0305243 B1. Его получают осаждением коагулирующих белков в разбавленном этиловом спирте, имея в качестве исходного продукта цельную плазму крови. Этот продукт имеет гораздо лучшие характеристики, чем предшествующие продукты. Этот продукт переходит в раствор при комнатной температуре менее чем за 10 минут, что удовлетворяет одному из требований клиницистов. Несмотря на это преимущество, приготовление этого продукта является слишком продолжительным, поскольку введение этанола в плазму приводит к периоду осаждения для белков 12-24 часов. Это препятствует обработке на непрерывной основе, которая зачастую ожидается в промышленности. Третий способ получения биологического клея, разработанный в Германии, описан в патенте DE N 3622642 A1. Этот клей, похожий на описанные в вышеупомянутых патентах, имеет то преимущество, что он быстро солюбилизируется в водном растворе при комнатной температуре, но способ его получения все еще требует применения в качестве вспомогательных средств ингибиторов протеза, альбумина, протромбина и антитромбина.

Согласно данному изобретению концентрат должен быть подвергнут вирусной инаktivации путем смешивания растворителя и детергента для разрушения патогенных вирусов, таких как вирус гепатита или вирус СПИДа. Конечный продукт, полученный описанным способом, подвергается модификации в его структуре или биологической активности. Эти свойства продукта связаны с его поведением при солюбилизации и стабильностью, которые дают ему широкий диапазон применений.

Этот концентрат солюбилизируется менее чем за 10 минут при комнатной температуре без какого-либо специального оборудования. Он стабилен в течение нескольких часов после его растворения.

Автор изобретения разработал также способ как оригинальный, так и простой, для получения белкового концентрата, способного коагулировать в присутствии тромбина просто путем холодного "высаливания" при слегка основном pH.

Этот способ дает более 85% коагулируемого фибриногена от общего белка, присутствующего в концентрате, значительное количество стабилизирующего фибрин фактора (Фактора XIII), удовлетворительное количество

фибронекина и, самое главное, он позволяет исключить плазминоген, профермент, известный своими фибринолитическими свойствами. Плазминоген, если он присутствует, оказывает неблагоприятное воздействие на продукт.

Изобретение состоит в приготовлении концентрата, богатого белками, коагулируемыми тромбином. Этот концентрат получают осаждением солью (например, солью уксусной кислоты) плазмы человека или животного в качестве исходного материала. Осадок содержит более 85 мас.% коагулируемого фибриногена, а также фактора XIII, осаждающегося вместе с фибриногеном. Этот фактор XIII присутствует в концентрации по меньшей мере 300-400 ME на грамм белка (или 300-350 ME/g фибриногена).

Термин "соль", как подразумевается в данном описании, включает любые приемлемые соли (как органических, так и неорганических кислот), пригодные для высаливания. При этом, упомянутая выше соль уксусной кислоты, являющаяся органической солью, представляет собой один из конкретных вариантов воплощения настоящего изобретения. Кроме того, следует отметить, что использование солей органических кислот имеет преимущественно перед солями неорганических кислот, поскольку при использовании последних требуется большее их количество для достижения эффекта "высаливания", при этом белки могут быть денатурированы, что не является желательным.

Этот концентрат, в противоположность продаваемым в настоящее время, солюбилизируется быстро в водном растворе при комнатной температуре за менее чем 10 минут и имеет содержание белка до 150 мг/мл. Кроме того, он остается стабильным в течение по меньшей мере 24 часов после реконституирования при температуре между 4 и 37°C. Концентрат содержит также сбалансированное количество фибронекина в диапазоне 0,06±0,02 г/г белка. Концентрат согласно изобретению получают способом, включающим в себя стадию осаждения цельной плазмы солью при достаточной концентрации, для достижения процесса высаливания при pH между 7,50 и 8,50 в присутствии амино-6-гексановой кислоты и при температуре между 0 и 4°C. Никаких особых предосторожностей не требуется, коагулируемые белки осаждаются быстро и полностью, а не после многих часов или даже нескольких дней, как это имеет место в существующих патентах. Добавление амино-6-гексановой кислоты устраняет аффинность плазминогена в отношении фибриногена и делает эти два белка легко разделяемыми.

Этот способ можно приспособить к промышленному получению со значительной экономией времени и для непрерывного процессинга (обработки).

Цельную плазму приводят в контакт с солью при минимальной концентрации приблизительно 0,5 M на литр плазмы в присутствии минимальной концентрации 50 mM амино-6-гексановой кислоты. Коагулируемые белки осаждаются при перемешивании за несколько минут. Продолжительность осаждения в идеале

должна быть по меньшей мере 30 минут для максимального излучения. Оставшийся раствор отделяют центрифугированием и его можно использовать для получения других белков плазмы.

После центрифугирования осадок переводят в раствор в буфере Трис-цитрат натрия. Затем концентрация белка составляет приблизительно 20-30 мг на мл раствора, pH регулируют добавлением L-гистидина. Затем этот раствор подвергают процессу, имеющему своей целью инактивацию патогенного вируса, такого как вирусы СПИДа и гепатита, такой процесс описан в патентах США USP 4405573, 4764363 и 4820805. Он состоит в обработке растворителем-детергентом при 28°C в течение 6 часов при осторожном перемешивании. Затем содержание белка находится между 10 и 15 мг/мл. Органические продукты, применяемые для инактивации этих вирусов, отделяются во время осаждения белка при помощи солей и аминокислоты. Их затем удаляют центрифугированием, причем раствор супернатанта содержит органические продукты, а также примесные белки, такие как альбумин и иммуноглобулины. Осадок, полученный после этой стадии, тщательно промывают слегка подкисленной чистой водой.

Эти промывки устраняют также остаточные химикаты, примесные белки и соли, такие как цитрат, которые неблагоприятно воздействуют на эффективность коагуляции.

Конечный осадок переводят опять в раствор в буфер, содержащий Трис и L-гистидин. Наконец, этот белковый раствор фильтруют, затем стерилизуют фильтрованием. Стерильный раствор помещают в колбы в условиях абсолютной стерильности. Эти колбы лиофилизируют в течение 48 часов.

Следующие далее примеры дают более легкое описание способа приготовления концентрата в соответствии с этим изобретением.

Пример 1

Свежую плазму, замороженную до менее -35°C, быстро размораживают при 37°C и затем инкубируют при этой температуре в течение по меньшей мере 15 минут в присутствии минимальной концентрации 50 мМ аминокислоты. Затем охлаждают до 0-4°C. К предварительно охлажденной плазме добавляют ацетат натрия или калия при скорости один моль на литр плазмы. Раствор непрерывно перемешивают в течение 1 часа при 0-4°C и центрифугируют при 3700 об/мин (тип ротора JS 4,2; Beckman J6-МС центрифуга) при 4°C в течение 20 минут. Получают осадок, богатый фибриногеном и фактором XIII, который переносят в сосуд, содержащий 1% раствор Трис и 1,6% цитрат натрия, pH 7,30. Осадок солилизируют при комнатной температуре с магнитной мешалкой. Описанный выше буфер добавляют, если нужно, для получения концентрации белка приблизительно 20-22 мг/мл. В этой точке добавляют L-гистидин при скорости 0,2-0,3 г на грамм белка. Затем этот белковый раствор пропускают через фильтры с пористостью 0,8 микрон. Отфильтрованный таким образом

раствор подвергают обработке для инактивации вирусов путем смешивания с равным объемом раствора, содержащего 1% Трис, 1,6% цитрат натрия (pH 7,3), 2% Твин 80 R и 0,6% Три-н-бутилфосфат (TNBP).

Это приводит к конечной концентрации приблизительно 10 мг/мл белков, 1% Твин 80 и 0,3% TNBP. Раствор инкубируют при 28°C при постоянном перемешивании в течение 6 часов. После обработки для инактивации вирусов, белковый раствор охлаждают между 0°C и 4°C и затем при минимальном перемешивании добавляют 50 мМ аминокислоты. Добавляют количество ацетата, эквивалентное 1 моль, и осадок появляется мгновенно. Перемешивание продолжают в течение 1 часа при между 0°C и 4°C. Растворитель, детергент и загрязняющие белки устраняют центрифугированием. Осадок извлекают и промывают несколько раз 0,1% раствором Трис (pH 4,50-5,0), пока не будет достигнут нейтральный pH. Число промывок может быть уменьшено проведением простого диализа или диализирования, после того как осадок переводят в раствор в 0,5% Трис (pH 7,30).

Промытый осадок растворяют в 0,5% раствор Трис. После полной солилизации корректируют pH и осмолярность раствора, pH доводят до 7,30-7,50. Конечная концентрация белка равна приблизительно 30-35 мг/мл раствора. Добавляют количество L-гистидина, соответствующее 0,2-0,3 г на грамм белков, и количество сахарозы, эквивалентное 50% (масса/масса) по отношению к белку. Конечный раствор белка фильтруют и упаковывают при стерильных условиях, затем его лиофилизируют в течение 48 часов.

Пример 2

Лиофилизированный продукт, полученный этим способом, реконституировали с 1 мл дистиллированной воды для каждого флакона и анализировали биохимически.

Результаты этих анализов позволяют определить состав и качество концентрата в соответствии с данным изобретением как биологического клея.

А. - Биохимический анализ (пример 1):

Содержание белка концентрата является следующим:
Коагулируемый фибриноген (измеренный гравиметрией): 95-105 мг/мл
Эндогенный Фактор XIII: 35-40 МЕ/мл
Фибронектин: 4-6 мг/мл
Плазминоген: 0,010-0,015 мг/мл
Альбумин: 0,10-0,20 мг/мл
Иммуноглобулины: IgA 0,20-0,30 мг/мл
IgG: 0,50-0,60 мг/мл
IgM: 0,20-0,30 мг/мл

Как упомянуто выше, полученный согласно данному изобретению концентрат характеризуется превосходной растворимостью и стабильностью. Он переходит в раствор менее чем за 5 минут при комнатной температуре (20°-25°C) всего лишь при ручном встряхивании. В качестве растворителя для нашего продукта мы выбрали чистую воду, поскольку это дает явные преимущества для нашего биохимического анализа. Тем не менее, подобно другим коммерческим продуктам, инстант-концентрат (концентрат для немедленного растворения) должен быть

восстановленным (реконституированным) в растворе апротинина во избежание фибринолиза при контакте с частями тела, т.к. такой фибринолиз ухудшает стабильность клея.

Мы не заметили разрушения при дестабилизации продукта, восстановленного в чистой воде при 4°C или при 20°C в течение периода времени, который мог длиться более 24 часов, что позволяет предположить, что концентрат не содержит протеаз.

После восстановления в воде фибриноген смешивают с раствором тромбина в присутствии хлорида кальция. Образованный таким образом фибрин совершенно не обнаруживал экссудации.

В. - Анализ адгезионной прочности:

Адгезионная способность, определяемая на животных посредством склеивания кусочков кожи мышей, превышала 200 г/см³. Такая адгезионная способность была также показана склеиванием двух кусков марли; этот тест описан на эскизе ниже. Продукт абсолютно стабилен в течение 24 часов при поддержании температуры 4°C или 20°C. Адгезионная способность, определенная этим способом, равна 350±20 г/см³ после 10 минут контакта при давлении 1 кг для смеси 0,050 мл белкового раствора, 0,050 мл бычьего тромбина (100 МЕ/мл) в 40 мМ хлорида кальция. Тест после 24-часового периода выдерживания показывает, что адгезионная способность остается неизменной.

С. - Оценка биосовместимости:

Оценку биосовместимости инстант-клея проводили с использованием культивируемых клеток. Эта оценка была направлена на цитотоксичность и цитосовместимость (пролиферацию клеток, синтез ДНК и т.д.).

Культивируемые клетки были Balb 3T3 клетками и/или фибробластами кожи человека. Цитотоксичность измеряли по включению красителя нейтрального красного. Если клетки являются живыми, они пропитываются этим красителем, который прикрепляется к клеточным липосомам. Если клетки мертвые, то они не воспринимают краситель. Дозирование красителя производят после 72 часов контакта с клетками. Оценка жизнеспособности этих клеток может быть также выполнена наблюдением под микроскопом (Canadian Standard CAN 3-2310, 6-M 84) или подсчетом клеток.

Клей не является токсичным при описанных условиях. Он обладает увеличивающим действием на плотность клеток (45% для фибробластов и 12% для Balb 3T3 клеток).

Быстрая солюбилизация, высокая стабильность в растворе и отсутствие экссудации являются основными характеристиками концентрата согласно данному изобретению.

Эти характеристики обеспечивают высокую приспособляемость: экономию времени, быстрое растворение, варибельные температуры и использование в течение пролонгированного периода. Эти эксплуатационные качества показывают приспособляемость продукта к напряженным моментам при работе хирургов в операционных.

Эти концентраты белка, богатые

фибриногеном и Фактором XIII, получаемые для терапевтического применения согласно данному изобретению, могут быть получены из плазмы человека или животного и, следовательно, применимы либо в медицинской, либо в ветеринарной практике.

Формула изобретения:

1. Способ приготовления белкового концентрата, коагулируемого тромбином и содержащего в основном фибриноген, эндогенный Фактор XIII и фибронектин, характеризующийся тем, что он предусматривает следующие стадии: а) первое осаждение белков цельной плазмы добавлением соли в достаточном количестве для достижения высаливания указанных белков и pH 7,5 - 8,5, причем осаждение проводят при 0 - 4 °C в присутствии минимальной концентрации 50 мМ аминокислоты; б) первая солюбилизация осажденных белков в присутствии L-гистидина до конечной концентрации 0,2 - 0,3 г на грамм белков; в) стадия дезактивации вирусов в растворе растворителя - детергента; г) второе осаждение той же самой солью, что и в стадии а) при той же температуре в присутствии той же самой концентрации аминокислоты; д) промывание осадка слегка подкисленной чистой водой; е) вторая солюбилизация осадка в присутствии L-гистидина, как в стадии б); ж) добавление 50% сахарозы по отношению к количеству белков; з) стерильное фильтрование; и) распределение аликвот стерильно профильтрованного концентрата в стерильные флаконы, и j) лиофилизация.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанная соль представляет собой ацетат натрия или калия.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что первую и вторую стадии осаждения проводят в течение периода времени по меньшей мере 30 мин.

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что стадию е) проводят при 2 °C с водой, охлажденной до 2°C.

5. Способ по п.1, отличающийся тем, что стадии а), д) и е) проводят при комнатной температуре в течение по меньшей мере 30 мин.

6. Способ по п.1, отличающийся тем, что после стадии е) следует растворение осадка в слегка основной чистой воде и диализ или диафильтрация.

7. Способ по п.1, отличающийся тем, что слегка подкисленная чистая вода является раствором Трис-HCl (0,1% с pH 4,5 - 5,0).

8. Способ по п.6, отличающийся тем, что слегка основная чистая вода, используемая для растворения осадка перед диализом или диафильтрацией, является раствором 0,5% Трис, pH 7,3.

9. Способ по п.1, отличающийся тем, что первую солюбилизацию проводят в 1% Трис и 1,6% цитрате натрия, pH 7,30, для доведения концентрации белка до 20 - 22 мг/мл перед добавлением L-гистидина.

10. Способ по п.1, отличающийся тем, что вторую солюбилизацию проводят в 0,5% Трис pH 7,30 для доведения концентрации белка до 30 - 35 мг/мл перед добавлением L-гистидина.

11. Способ по п.1, отличающийся тем, что

RU 2130946 C1

дезактивацию вирусов выполняют при 28 °С в течение 6 ч при непрерывном перемешивании в растворе, состоящем из 10 мг/мл растворенных белков, 1% Твин 80® и 0,3% Три-н-бутилфосфата.

12. Способ по п.1, отличающийся тем, что лиофилизированный концентрат

растворяется в воде менее чем за 5 мин при ручном перемешивании.

13. Способ по п.12, отличающийся тем, что растворенный концентрат стабилен при 4 - 20 °С в течение по меньшей мере 24 ч.

14. Способ по п.1, отличающийся тем, что плазма имеет человеческое или животное происхождение.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

-7-

RU 2130946 C1